

薬剤のみを用いて多能性幹細胞（ES 細胞・iPS 細胞）から 三次元的に骨様組織を作製することに成功

1. 発表者：

大庭 伸介（東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター臨床医工学部門 准教授
／同学大学院工学系研究科兼担）

鄭 雄一（東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 教授／
同学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター臨床医工学部門兼務）

2. 発表のポイント：

- ◆薬剤のみを誘導剤として用い、マウス多能性幹細胞（ES 細胞、iPS 細胞）から三次元的に骨様組織を作製することに成功した。
- ◆多能性幹細胞の維持、骨形成性細胞（骨芽細胞）への誘導と成熟、骨基質の沈着と石灰化までの一連の流れを、組成が不明なものを一切含まない三次元培養系により達成した。
- ◆本法は、生体内の臓器を模倣した三次元組織を試験管内で作製する基盤技術となると期待される。

3. 発表概要：

ES 細胞や iPS 細胞といった多能性幹細胞（注 1）から種々の細胞を作製し、培養皿上で三次元的に組織様構造体を作ることは、再生医療のみならず、組織形成過程の理解や治療用薬剤の開発に貢献すると考えられます。作製にあたっては、安全性やコストの観点から、従来から用いられてきたウシ胎仔血清のように組成が不明なものや、遺伝子導入、組換えタンパク質を使用せずに、目的とする細胞を三次元的に誘導できることが理想的です。

東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター臨床医工学部門の大庭伸介准教授と鄭雄一教授の研究グループは、薬剤のみを誘導剤として用い、組成が不明なものを一切含まない培養系（培地や担体の組成の全てが明らかな培養系）で、マウス多能性幹細胞から三次元的な骨様組織を作製する方法を開発しました。

本研究成果は、生体内の臓器を模倣した三次元組織を培養皿上や試験管内で作製する基盤技術となると期待されます。本研究の内容は、2017 年 5 月 12 日に、米国科学振興協会（American Association for the Advancement of Science: AAAS）のオンライン科学雑誌「Science Advances」で発表されました。

4. 発表内容：

ES 細胞や iPS 細胞といった多能性幹細胞から種々の細胞を作製し、培養皿上で三次元的に組織様構造体を作ることは、再生医療のみならず、組織形成過程の理解や治療用薬剤の開発に貢献すると考えられます。作製にあたっては、安全性やコストの観点から、従来から用いられてきたウシ胎仔血清のように組成が不明なものや、遺伝子導入、組換えタンパク質を使用せずに、目的とする細胞を三次元的に誘導できることが理想的です。この観点から、血清・遺伝子導入・組換えタンパク質の代わりに低分子化合物を用いて幹細胞を維持したり、目的とする細胞への分化や増殖を制御する方法が最近注目を集めています。大庭伸介准教授らの研究グループは 2014 年に、組成が不明なものを用いることなく、4 種類の薬剤のみを誘導因子として用いるこ

とにより、多能性幹細胞から中胚葉（注2）を經由して効率的に骨芽細胞（注3）を誘導する方法を開発しました（注4）。本研究では、この誘導方法を、アテロコラーゲン（注5）スポンジを担体として用いた三次元培養系に応用することで、マウス多能性幹細胞から三次元的に骨様組織を作製することに成功しました。

マウス ES 細胞・マウス iPS 細胞の多能状態は、MEK 阻害剤（PD0325901）及び GSK3 阻害剤（CHIR99021）を用いた培養法（注6；2i 培養法）により、無血清・無フィーダーで維持できることが報告されています。研究グループはまず、アテロコラーゲンスポンジ担体を用いた三次元培養系においても、上記の二つの阻害剤（2i）を用いることでマウス ES 細胞を維持できることを確認しました。興味深いことに、培養皿を用いた従来の二次元培養系とは異なり、三次元培養系では 2i を除去してもマウス ES 細胞の多能性を維持できることも見出しました。また、この三次元培養系で維持されたマウス ES 細胞を、適切な低分子化合物の組み合わせで処理すると、三胚葉（注7）それぞれに誘導できることが確認されました。

次に、上記の三次元培養系によって、マウス ES 細胞・iPS 細胞から目的とする細胞の最終分化を誘導できるかを検討しました。研究グループが以前報告した骨芽細胞を誘導する4種類の薬剤を（注4）三次元培養系に添加すると、中胚葉を介して骨芽細胞が形成され、骨組織の重要な特徴である基質の石灰化が誘導されました。つまり、培地や担体の組成の全てが明らかでない三次元培養系において、4種類の薬剤を用いてマウス多能性幹細胞から誘導された骨形成性細胞（骨芽細胞）によって骨様組織が形成されたと考えられます。

生体の骨組織においては、骨芽細胞はさらに成熟して骨細胞となります。骨細胞は、骨を吸収する破骨細胞（注8）の形成を誘導するほか、外部からの刺激に応答することで、骨代謝における司令塔としての役割を果たすことが提唱されています。本研究で開発した三次元培養系では、マウス ES 細胞から骨芽細胞のみならず骨細胞も誘導されることが分かりました。この三次元培養系において、マウス ES 細胞から骨細胞を誘導したのちに破骨細胞の前駆細胞を担体中に加えると、担体内で破骨細胞が形成されました。このことは、本三次元培養系によりマウス ES 細胞から誘導された骨芽細胞・骨細胞が、生体におけるものと同様に破骨細胞形成誘導能を有し、機能的であることを示唆しています。

本研究で開発した、薬剤のみを用いてマウス多能性幹細胞から骨芽細胞・骨細胞を含む骨様組織を三次元的に作製する手法は、生体内の臓器を模倣した三次元組織を試験管内で効率的に作製するための基盤技術の一つとなると考えられます。特に、骨芽細胞・骨細胞・破骨細胞という骨の形成と維持を制御する細胞が三次元的に機能する骨様組織を、多能性幹細胞を用いて培養皿上・試験管内で作製できる可能性を提示するものです。これにより、骨粗鬆症をはじめとした種々の骨疾患の治療薬開発や骨再生医療のみならず、骨組織に生じる疾患の理解や骨組織の形成と維持のメカニズムの理解に貢献することが期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名： Science Advances（オンライン版：5月12日）

論文タイトル： Three-dimensional system enabling the maintenance and directed differentiation of pluripotent stem cells under defined condition

著者： Denise Zujur, Kosuke Kanke, Hironori Hojo, Alexander C. Lichtler, Ung-il Chung, Shinsuke Ohba*（*責任著者）

6. 問い合わせ先：

東京大学大学院医学系研究科 附属疾患生命工学センター 臨床医工学部門
准教授 大庭 伸介 (おおば しんすけ)

〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1

E-mail: ohba@m.u-tokyo.ac.jp

電話：03-5841-1701

FAX：03-5841-1428

7. 用語解説：

(注1) 多能性幹細胞：

体内のあらゆる組織に分化できる能力（多能性）と無限の増殖能を持つ幹細胞の総称。胚盤胞期の内部細胞塊より作られる胚性幹細胞（ES 細胞）、体細胞を初期化することで多能性が獲得される人工多能性幹細胞（iPS 細胞）が挙げられる。

(注2) 中胚葉：

発生の初期過程において分けられる三つの区域の一つであり、骨格、筋肉、心臓、血管などのもととなる。

(注3) 骨芽細胞：

骨基質の形成を担う細胞。骨の形成様式には頭蓋骨の形成などに代表される①膜性骨化と、長管骨の形成に代表される②軟骨内骨化が存在する。前者では外胚葉細胞を起源とする神経堤より、後者では中胚葉細胞を起源とする未分化間葉細胞から骨芽細胞が発生する。

(注4) 参考資料：

- Kanke K, Masaki H, Saito T, Komiyama Y, Hojo H, Nakauchi H, Lichtler AC, Takato T, Chung UI, Ohba S: Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions. *Stem Cell Reports* 2(6):751-760, 2014
- 2014年5月23日 東京大学大学院医学系研究科・医学部プレスリリース
「4種類の低分子化合物のみを用いて無血清培地化で多能性幹細胞から骨芽細胞を作製」
http://www.m.u-tokyo.ac.jp/news/admin/release_20140523-3.pdf

(注5) アテロコラーゲン：

生体に存在するコラーゲン分子から、免疫反応を起こす性質（抗原性）を有するテロペプチドとよばれる部分を除去したもの。生体材料として広く使用されている。

(注6) 2i 培養：

従来、ウシ胎仔血清含む培地中でフィーダー細胞と共に培養するか、白血病阻止因子（leukemia inhibitory factor-LIF）や骨形成性タンパク質（bone morphogenetic protein-BMP）を含む培地で培養しなければ、マウス ES 細胞の多能性を保つことができないとされていた。2008年に南カリフォルニア大学の Qi-Long Ying 准教授、ケンブリッジ大学ウェルカム・トラスト幹細胞研究センターの Austin Smith 教授らは、二種類の低分子化合物を用いることで、無血清培地中でフィーダー細胞を用いることなくマウス ES 細胞の多能性を維持して培養できることを報告した。二種類の化合物がそれぞれ、GSK3（CHIR99021）、MEK（PD 0325901）という細胞内情報伝達因子の選択的阻害剤（inhibitor）であることから、2i 培養と呼ばれる。

(注7) 三胚葉：

発生の初期過程において分けられる三つの区域であり、将来の運命（どのような細胞になるか）がそれぞれ決定されている。外胚葉（神経、皮膚、歯などを形成）、中胚葉（骨格、筋肉、心臓、血管などを形成）、内胚葉（消化管、肺、気管などを形成）からなる。

(注 8) 破骨細胞：

多核を有する巨大な細胞で、骨組織の吸収にはたらく。血球系の単球マクロファージに由来する。生体の骨組織においては、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が協調して行われることで（カップリング）、常に新しい骨組織に入れ替わっている（骨リモデリング）。骨の量は骨吸収と骨形成のバランスによって保たれている。

8. 添付資料：

（図 1） 本法によって作製されたマウス ES 細胞由来三次元骨様組織断面の組織像。（A）位相差像。担体内部の小孔に細胞が凝集して存在する。（B）骨芽細胞マーカーである SP7 蛋白質の発現（赤）。担体内部の細胞が SP7 陽性の骨芽細胞であることを示す。（C）核染色像（青）。（D） A、B、C の重ね合わせ像。

